棉铃虫脑在控制滞育中的作用

王方海[1]，龚　和[2]，钦俊德[2]

（1. 中山大学昆虫学研究所，生物防治国家重点实验室，广州　510275；2. 中国科学院动物研究所，北京　100080）

摘要：脑摘除试验表明：棉铃虫蛹的初期发育（化蛹后 12 h 内）受脑的控制；化蛹 12 h 后的滞育蛹发育与脑无关。注射活性脑的匀浆液可阻止部分注定滞育的预蛹和化蛹后 1～2 天的蛹进入滞育状态，说明滞育的个体很有可能从预蛹期开始其脑的活性就已降低。

关键词：棉铃虫；滞育；脑

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）03-0416-03

Role of brain in controlling diapause in *Helicoverpa armigera*

WANG Fang-Hai[1]，GONG He[2]，QIN Jun-De[2]（1. State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology，Zhongshan University，Guangzhou　510275，China；2. Institute of Zoology，Chinese Academy of Sciences，Beijing　100080，China）

Abstract：It was confirmed that the pupae of *Helicoverpa armigera* needed brain in the early development stage by the experiment of brain excision. The development of diapause pupae did not need brain in the mid or later development stage. The pupal diapause in *H. armigera* could be terminated with the injection of active brain，and it was suggested that the activation of brain in diapause-destined *H. armigera* had descended since prepupal stages. The role of brain in diapause in *H. armigera* was discussed based on these results.

Key words：*Helicoverpa armigera*；diapause；brain

有关棉铃虫滞育的研究，已有的报道绝大多数集中在生态因子的调控方面（李超和谢宝瑜，1981；吴孔明和郭予元，1995，1996），对内部调控机制的报道甚少。我们的初步研究证实滞育和非滞育棉铃虫蛹血淋巴中类固醇蜕皮素含量差异显著（王方海和龚和，1997），这主要与前胸腺活性的高低有关，而前胸腺的活性主要受脑分泌的神经肽（PTTH）调控。通过显微和亚显微结构的观察，已发现滞育和非滞育棉铃虫蛹脑的形态组织学结构存在着一定的差异，似乎表明棉铃虫脑在滞育中起着一定的调控作用（王方海等，1997）。本实验利用脑摘除及脑匀浆液注射等方法进一步查明棉铃虫脑在其滞育中的调控作用。

1　材料与方法

1.1　实验昆虫

虫源系采自河南郑州，在 25℃、每天光照 16 h 的条件下用人工饲料（吴坤君，1985）饲养繁殖。滞育处理的棉铃虫在 20℃、每天光照 10 h 的条件下饲养，其滞育率可达 100%；非滞育处理的棉铃虫在 20℃、每天光照 16 h 的条件下饲养。

1.2　蛹脑的摘除

分别在化蛹后 12 h 内、12～24 h 和 24～36 h，摘除滞育和非滞育蛹脑，消毒封口后放在 30℃下，观察其发育情况。

脑摘除过程如下：取小块塑料泡沫，在中央部位挖一小孔，将蛹竖插其中，蛹前端外露，削去最前端的一小片蛹壳，在解剖镜下，用消毒过的沾有少量苯基硫脲、青霉素和链霉素（1∶1∶1）粉末的尖头镊从小孔中将脑取出，立即用石蜡封好手术伤口。

1.3　脑匀浆液的注射

将进入预蛹期 3 天左右的非滞育个体的脑取

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39870475）

第一作者简介：王方海，男，1965 年 10 月生，博士，副研究员，主要从事昆虫生理学研究，E-mail：wangfanghai@hotmail.com

收稿日期 Received：1999-05-24；接受日期 Accepted：2000-05-09

出，加入少量生理盐水，匀浆、离心，取其上清液注射进饲养在滞育条件下的预蛹和刚化蛹后 1～2 天的蛹中。分 2 个处理：①每头注射相当于 1 个脑的匀浆液，②每头注射相当于 3 个脑的匀浆液。处理完毕后，将所有个体放回原来的滞育条件下，观察其滞育情况。

1.4 SDS-PAGE 线性梯度电泳

SDS-PAGE 线性梯度电泳的梯度范围为 5%～15%。电泳装置为 BIO-RAD MIN-PROTEIN II。整个电泳过程在冷柜中进行，温度控制在 4℃左右，所需时间大约为 60～90 min。电泳结束后，取出凝胶并将其置于染色液（含 0.1% 的考马斯亮蓝 R-250、40% 甲醇、10% 冰乙酸）中固定、染色 30 min，然后再置于脱色液（含 40% 甲醇、10% 冰乙酸）中脱色。所用标准蛋白为肌球蛋白（200 kD），β-半乳糖苷酶（116.25 kD），磷酸化酶 B（92.5 kD），牛血清蛋白（66.2 kD），卵清蛋白（45 kD）。详见（王方海和龚和，1997）。

2 结果和分析

2.1 脑的摘除试验

为了弄清脑在发育中的作用，我们摘除非滞育蛹脑，看其能否正常发育。结果见表 1。10 天后检查，在化蛹后 12～24 h 和 24～36 h 间摘除脑的两处理中，大部分个体开始发育；在化蛹后 12 h 内摘除脑的处理中，所有个体均没有发育的迹象。说明蛹在早期发育阶段（化蛹时间小于 12 h）离不开脑。滞育蛹的发育是不是必须有脑的存在？针对这个问题，我们也进行了脑的摘除手术，结果见表 1。化蛹后 12～24 h、24～36 h、大于 36 h 及对照中的多数个体在一个月之内就已开始发育，而化蛹后 12 h 内处理中的所有个体均停留在滞育阶段，无发育现象。由此可看出，滞育蛹在化蛹 12 h 以后的发育与有无脑的存在关系不大。

通常情况下，脑是通过某些神经分泌细胞合成释放 PTTH（Agui *et al.*，1979；Mizoguchi *et al.*，1990），促进前胸腺合成分泌蜕皮素，从而对蛹滞育的调节起到了一定的作用。在不同的虫种之间，由于脑释放 PTTH 的时间不同，对滞育所表现出的调控作用往往也明显的不同。我们的试验结果表明棉铃虫的脑应在滞育早期（化蛹后不超过 12 h）释放 PTTH，对前胸腺产生刺激作用。因此，在棉铃虫的滞育过程中，脑的调节作用主要发生在滞育的早期，滞育的中后期则基本上不受脑的调节，若在此时摘除蛹脑，滞育蛹经过一定的时间后，可照常发育。

表 1 被摘除脑的棉铃虫蛹的发育情况*

Table 1 Development of *H. armigera* pupae with brain excised

摘脑时间 Time of brain excision	供试蛹数 Number of pupa tested	注定非滞育蛹 Non-diapause-destined pupa	注定滞育蛹 Diapause-destined pupa
<12 h	10	不发育	不发育
12～24 h	10～25	发育	发育
24～36 h	10～20	发育	发育
>36 h	25	—	发育
对照 CK	20	发育	发育

* 手术后均放于 30℃、每天光照 16 h 的条件下，注定非滞育蛹在处理 10 天后观察发育情况，注定滞育蛹在处理 30 天后观察发育情况 The pupae were kept at 30℃ and 16 h after treatment. The status of development of non-diapause-destined and diapause-destined pupa was checked the 10th and 30th day after treatment, respectively

2.2 脑匀浆液注射实验

注射注定非滞育蛹的预蛹（3 天）脑匀浆液的结果如表 2。当每头滞育蛹只注射 1 个脑的匀浆液时，15 天内，被处理蛹中有 2 头发育，被处理预蛹所化的蛹中也有 2 头发育，45 天后两处理中均没有再发育的个体。当每头注射 3 个脑的匀浆液时，被处理蛹在 15 天内全部死亡，无一发育，被处理预蛹中，6 头死亡，5 头化蛹，同样无一发育，45 天仍无发育的迹象。由于活性脑可阻止部分注定不是在预蛹期滞育和化蛹后 1～2 天的蛹进入滞育状态，故注定滞育的个体很有可能从预蛹期开始其脑的活性就已降低。注射剂量提高到 3 个脑的匀浆液/蛹时，不仅不能阻止任一个体进入滞育状态，处理个体死亡数反而增加，这可能与注射量增加，外来物增多有关。

表2 注定非滞育蛹的预蛹脑匀浆液对滞育蛹发育的影响

Table 2 Effect of brain of prepupa of non-diapause-destined pupa on the development of pupal diapause

	1 脑匀浆液/每头 1 brain / pupa		3 脑匀浆液/每头 3 brains / pupa	
	蛹 Pupa	预蛹 Prepupa	蛹 Pupa	预蛹 Prepupa
15天（15th day）	7* 2头发育 1头死亡 4头无发育	10* 8头化蛹 2头死亡 （2头10天后发育）	7* 全部死亡	11* 5头化蛹 6头死亡
45天（45th day）	无发育	无发育	—	无发育

* 供试虫数 number of individuals tested

参 考 文 献（References）

Agui N, Granger N A, Gilbert L I *et al.*, 1979. Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: *in vitro* assay of a single neurosecretory cell. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 5 694－5 698.

Li C, Xie B Y, 1981. Combined effects of photoperiod and temperature on the diapause of *Helicoverpa armigera*. *Kunchong Zhishi*, 18 (2): 58－61. [李超，谢宝瑜，1981. 光周期和温度的联合作用对棉铃虫种群滞育的影响. 昆虫知识，18 (2): 58－61]

Mizoguchi A, Oka T, Kataoka H, *et al.*, 1990. Immunohistochemical localization of prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of *Bombyx mori*. *Develop. Growth Differ.*, 32 (6): 591－598.

Wang F H, Gong H, 1997. The role of ecdysteroids on diapause of *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol. Sin.*, 40 (3): 261－264. [王方海，龚和，1997. 滞育和非滞育棉铃虫血淋巴类固醇蜕皮素含量变化的比较. 昆虫学报，40 (3): 261－264]

Wang F H, Gong H, Qin J D *et al.*, 1997. The brain morphology of diapause- and non-diapause-destined *Helicoverpa armigera*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 36 (6): 20－24. [王方海，龚和，钦俊德，甘雅玲，1997. 滞育和非滞育棉铃虫脑的组织解剖学研究. 中山大学学报，36 (6): 20－24]

Wu K J, 1985. A Lucerne-wheat germ diet for rearing the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Entomol. Sin.* 28 (1): 22－29. [吴坤君，1985. 棉铃虫的紫云英——麦胚人工饲料. 昆虫学报，28 (1): 22－29]

Wu K M, Guo Y Y, 1995. Inducing factors of pupal diapause in *Helicoverpa armigera*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 22 (4): 331－336. [吴孔明，郭予元，1995. 棉铃虫滞育的诱导因素研究. 植物保护学报，22 (4): 331－336]

Wu K M, Guo Y Y, 1996. Investigations on the migration and diapause in *Helicoverpa armigera*—diapause termination and emergence pattern in *Helicoverpa armigera*. *Acta Agricultura Sinica*, 29 (1): 15－20. [吴孔明，郭予元，1996. 棉铃虫迁飞与滞育的研究——棉铃虫滞育解除与羽化形式. 中国农业科学，29 (1): 15－20]